

イネ培養細胞の産生する α -アミラーゼアイソザイム (AMY-?, AMY-?)のタンパク質工学的研究

著者	安部 玲
号	573
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/16837

氏 名(本籍)	あ 安	べ 部	れい 玲
学 位 の 種 類	博	士	(農 学)
学 位 記 番 号	農	博	第 5 7 3 号
学位授与年月日	平	成	11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	イネ培養細胞の産生する α -アミラーゼアイソザイム (AMY-I, AMY-III) のタンパク質工学的研究		
論文審査委員	(主 査)	教 授	中 島 佑
		教 授	山 谷 知 行
		教 授	前 忠 彦

論文内容要旨

序論

アミラーゼは澱粉を加水分解する酵素の総称であり、現在その作用様式及び生成物の違いから3つのグループ、 α -アミラーゼ(EC3.2.1.1)、 β -アミラーゼ(EC3.2.1.2)、グルコアミラーゼ(EC3.2.1.3)に分けられる。この中でも α -アミラーゼは生物界での分布の広さ、澱粉分解における生理的役割の大きさ、生物当たりの生産量の大きさなどの点で他のアミラーゼを圧倒しており、食品工業をはじめ医薬など産業的にも非常によく利用されている酵素である。 α -アミラーゼは α -1,4グルコシド結合を2個以上含む多糖またはオリゴ糖の α -1,4グルコシド結合をエンド型に加水分解し、その生成物は α 型を示す。植物においては発芽種子の澱粉分解に主要な役割を果たし、それらは起源によらずほぼ同様の性質であることが明かとなっている。

近年、遺伝子の取り扱いの技術が進歩し、それに伴いタンパク質工学が飛躍的に発展した。タンパク質は固有の分子構造をもち、その構造と機能には密接な関係が成り立っている。 α -アミラーゼの立体構造は、*Aspergillus oryzae*の生産するTaka amylaseを始めとし、動物(Porcine pancreatic)、植物(Barley)、細菌(*Bacillus*)由来の α -アミラーゼの結晶化・X線構造解析により、 $(\alpha/\beta)_8$ バレル構造を持つことが示された。またその加水分解及び基質認識の機構も化学修飾や部位特異的変異などの手法により明らかにされつつある。

イネ(ササニシキ)の培養細胞は主に3つの α -アミラーゼのアイソザイム(AMY-I、AMY-II、AMY-III)を生産することが報告されている。AMY-Iはイネ発芽種子中に発現することが確認されたが、AMY-IIIは培養細胞でのみ発現が確認されている酵素である。またAMY-IIIは一般に知られている植物の α -アミラーゼとは酵素化学的に著しく異なった性質をもつ。至適温度が25℃と極端に低く、重合度11以上の短鎖アミロデキストリンあるいは生でんぷんにより著しく活性が阻害される。このような至適温度の低さ、ある一定の鎖長を持つ基質が結合することで活性の制御が行われるという性質は、これまでの α -アミラーゼの研究では報告例がない。本研究では、AMY-IIIの酵素化学的性質が酵素分子の立体構造上どのような因子によるものかをタンパク質工学的手法を用いて解析し、 α -アミラーゼの立体構造と触媒機能の相関関係を明らかにすることを目的とした。

第1章 AMY-I・AMY-IIIのcDNAのクローニング及び酵母を宿主とした発現系の構築

(1) cDNAのクローニング

培養10日目のイネ培養細胞(*Oryza sativa* cv Sasanishiki) 3 gよりmRNAを調製し、大腸菌プラスミドpBluescript II KSを用いcDNAライブラリーを作成した。AMY-IIIの部分アミノ酸配列をもとにオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCRを行った。得られたDNA断片をプローブとしcDNAライブラリーよりAMY-I、AMY-IIIをコードする遺伝子AMY-I、AMY-IIIを得た。AMY-Iは435アミノ酸をコードする1305ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームを含み、アミノ酸配列より計算される分子量は45,316 daltonであった。AMY-IIIは437アミノ酸をコードする1311ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームを含み、分子量は45,123 daltonであった。推定アミノ酸配列における両者の相同性は74 %と高いものであり、各種起源の α -アミラーゼファミリーに保存される4つの保存配列A、B、C、Dが存在した(Fig. 1)。

(2) 酵母を宿主とした発現系の構築

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターの下流にAMY-I、AMY-IIIを導入して作成した発現プラスミドpGAMY-I、pGAMY-IIIを用い、*Saccharomyces cerevisiae* YPH250を形質転換した。可溶性澱粉を含む培地上で形質転換株を生育させヨウ素を用いたプレートアッセイを行ったところ、AMY-I及びAMY-III共にハローを形成し、 α -アミラーゼが菌体外に分泌していることが示された。培養上清中のアミラーゼ活性を経時的に測定した結果、AMY-Iが培養80時間、AMY-IIIは18.5時間で最大となった(Fig. 2)。酵母を宿主として発現させたAMY-I、AMY-IIIはイネ培養細胞のAMY-IおよびAMY-IIIを抗原として作製した抗体と交差するものであり、至適温度及び17残基(G17)のマルトオリゴ糖を作用させた後の残存活性などの酵素化学的性質も、イネ培養細胞のものと一致していた(Table 1, Fig. 3)。AMY-IIIの酵素化学的性質を決定する領域を同定するため、8つのキメラ遺伝子を作成しキメラタンパク質の取得を試みたが分泌されないものがあり、またその活性の低さからも新たな発現系の構築が必要とされた。

第2章 大腸菌を宿主とした発現系の構築および精製方法の確立

(1) 大腸菌を宿主とした発現系の構築

強力な転写活性をもつT7プロモーターの下流にAMY-IおよびAMY-IIIの成熟型をコードするcDNAを導入し、この発現プラスミドを用いて*E. coli* BL21 (DE3) pT-groEを形質転換した。菌体内に発現した α -アミラーゼの分析はウェスタンブロット法と活性測定により行った。isopropylthiogalactoside(IPTG)による誘導時の培養温度が37℃の場合、AMY-IIIは大部分が不溶性画分に存在し活性も低かった。そこで誘導時の培養温度を25℃、18℃と低温にして発現を試み、活性を測定した。この結果、AMY-Iは37℃で誘導した場合でも活性をもつものの25℃で最も高くなり、それに比べAMY-IIIは37℃では活性は微弱であり、培養温度が低くなるにつれて活性も増加した(Fig. 4)。これは誘導温度が高い場合、発現タンパク質のフォールディングに問題があり、正しい立体構造をとることが出来ないためと考えられた。以下の実験では誘導条件を18℃、16時間とした。

(2) 精製方法の確立

発現タンパク質を効率よく精製するために、拮抗阻害剤であるシクロヘキサアミロース(α -CD)、シクロヘプタアミロース(β -CD)をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを用いた。AMY-Iには α -CD Sepharos 6B、AMY-IIIには β -CD Sepharos 6Bを用いることにより、1段階で単一のタンパク質に精製された(Fig. 5)。得られた精製酵素の性質をイネ培養細胞のものと比較した。7残基(G7)及び17残基(G17)のマルトオリゴ糖を作用させた後、可溶性澱粉を基質とした場合の残存活性はAMY-IIIのみ著しく低下した(Table 2)。次に至適温度を15℃から70℃の範囲で測定したところ、AMY-Iは55℃、AMY-IIIは25℃に至適温度を持っていた(Fig. 6)。この他至適pH、pH安定性、温度安定性を測定したところ、全てイネ培養細胞のものと一致していた。またCDスペクトルの測定により、二次構造上も一致していることを確認した。これらより*E. coli*で発現させたAMY-I、AMY-IIIはイネ培養細胞のものと同様の酵素化学的性質・立体構造を有し、有効な発現系及び精製方法が確立されたと考えられた。

第3章 タンパク質工学的手法を用いての性質支配領域の同定

(1) キメラタンパク質による性質支配領域の同定

AMY-IとAMY-IIIの一次構造を比較した場合、74%と高い相同性を持ちかつアミラーゼファミリーに保存される4つの保存配列も見出すことが出来るが、AMY-IとAMY-IIIの酵素化学的性質は異なるものである。そこでAMY-IとAMY-IIIを組換えたキメラタンパク質の性質を調べることにより、AMY-IIIの酵素化学的に特異な性質を支配する領域を同定することとした。まず制限酵素*Mlu* I、*Sca* I、*Nae* I、*Sal* Iの切断部位で組換えたキメラ遺伝子8つを作成し、これを先の大腸菌の発現系を用いキメラ酵素の取得、性質の検討を試みた(Table 3)。この結果、*Sca* Iと*Nae* Iの切断部位に挟まれた領域がAMY-Iの場合にはAMY-Iの性質を有し、AMY-IIIの場合にはAMY-IIIの性質を有していた(Fig. 7)。次に*Sca* Iと*Nae* Iの間に制限酵素*Nru* I、*Bgl* IIの切断部位を導入しこれらを用いて組換えたキメラ遺伝子を作成し、キメラタンパク質の性質を検討した(Table 4)。この結果、*Bgl* IIと*Nae* Iの切断部位に挟まれた領域がAMY-Iの場合にはAMY-Iの性質を有し、この領域がAMY-Iには重要であることが明かとなった。一方AMY-IIIは*Bgl* II以降だけではなく*Nru* Iと*Bgl* IIに挟まれた領域も関係していることが示唆された(Fig. 8)。

(2) 部位特異的変異法を用いた変異 α -アミラーゼの解析

Sca I、*Nae* Iの間に含まれるアミノ酸残基のうちAMY-IとAMY-IIIで異なるものについて部位特異的変異法により変異を導入した(Fig. 9)。至適温度の変化した変異体を得ることは出来なかったが、G17による阻害に関して、2又は3残基の変異により性質の変化したものが得られた。I-T186A、D187PはAMY-IIIと同レベルにまでG17により阻害され、I-S195N、C196T、K198N、I-Q223A、G2224Dは弱い阻害が見られた(Table 5)。以上のことより、AMY-IIIの*Nru* Iと*Bgl* IIに含まれるA186、P187はG17による阻害に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また至適温度の低さはアミノ酸レベルではなくhelixなどの高次構造によるものであることが示唆された。

第4章 AMY-IIIの17残基のマルトオリゴ糖(G17)による活性低下の分子機構

(1)CDスペクトル及びTrp蛍光による立体構造の解析

G17を作用させることによりAMY-IIIの活性が低下した場合、立体構造に変化がおこっているかを分光学的手法を用いて解析した。まずCDスペクトルによる解析を行った(Fig. 10)。G7、G17のアミロースを作用させた場合、二次構造の変化を示す遠紫外領域(200 nm ~ 250 nm)、及び三次構造の変化を示す近紫外領域(250 nm ~ 300 nm)共にスペクトルに違いは見られなかった。次に分子内Trp蛍光を測定した(Fig. 11)。G17を作用させた場合、G7に比べ最大蛍光を示す波長に変化はみられなかったが、蛍光は低下した。これは分子内Trpが表面に露出するといった大きな立体構造の変化は見られないものの、分子表面に存在するTrpがG17により覆われる可能性を示唆している。これらのことよりG17を作用させた場合、二次構造・三次構造などの立体構造には変化は見られないが、G17といった差長を持つ基質に対してのみ反応する基質結合部位の存在が示唆された。

(2)スブチリシン限定分解による立体構造の変化の解析

大腸菌で発現させたAMY-IIIを用い、活性の低下した状態でスブチリシンによる限定分解を行った。G17のマルトオリゴ糖を作用させた後の残存活性が低下していることを確認したのち、スブチリシンCarlsberg (E. C. 3. 4. 21. 14)を26℃2時間作用させ、これをSDS-PAGEに供した(Fig. 12A)。未処理またG7を作用させたものを限定分解した場合には22 kDa、25 kDaの2つのバンドが見られた。しかしG17を作用させたもの場合にはG7と同様の22 kDaのバンドの他、新たに27 kDaのバンドが見られた。これらのペプチドをシーケンサーに供し、N末端の配列を決定した(Fig. 12B)。この結果Asn220とGln221の間で切断されていることが明かとなった。

総合考察

イネ培養細胞の生産するAMY-IIIはこれまでに報告されている植物由来の α -アミラーゼとは異なり至適温度が25℃と極端に低い。AMY-IIIの耐熱性はAMY-Iと同等であり、この低温性は熱によるタンパク質変性による活性の低下ではないことと、アレニウスプロットよりその活性の変化は K_m ではなく k_{cat} に依存していることが明らかとなっている。また酵素化学的に特異な性質として、ある一定の鎖長を持つ基質(生澱粉や17残基のオリゴ糖)が結合した場合に活性が低下することがあげられる。

各種キメラタンパク質の性質検討により制限酵素Sca IとNae Iの切断部位の間に含まれる領域がAMY-IIIの性質に重要であることが明らかとなった。 α -アミラーゼは $(\alpha/\beta)_8$ バレル構造をとっており、この領域には α -helix-4、 β -sheet-5、 α -helix-5が含まれている。また新たに導入した制限酵素Bgl IIの切断部位は α -helix-4と β -sheet-5の間に位置する。Bgl IIの前後で組換えたキメラタンパク質の性質検討により α -helix-5が至適温度に関係することが示唆された(Fig. 8)。AMY-IとAMY-IIIにおける α -helix-4から α -helix-5までの一次構造の相同性は58%と全体に比べ低くなっており、 α -helix-4と α -helix-5の間には活性中心残基であるGlu204を含む β -sheet-5が存在する。このGlu204は触媒反応においてカルボニウム中間体を形成しその安定化の役割を果たしている。このことよりAMY-IIIの至適温度の低さ、25℃前後でのアレニウスプロットの彎曲は、Glu204の周辺の構造の違いによりカルボニウム中間体の形成または基質の解離の影響によるものと推察された(Fig. 13)。

また変異AMY-Iの解析により至適温度はAMY-Iと同じ50℃でありながら、G17により活性が低下するI-T186A, D187Pが見出された(Table 5)。オオムギ α -アミラーゼではこの近くに位置するGln226, Val229, Asp233が生澱粉との結合部位であることが明らかとなっている。AMY-IIIではGln226, Val229, Glu233となっており、これらとAla187, Pro188が鎖長の長い基質にのみ結合する可能性が十分に考えられる(Fig. 13)。またスブチリシン限定分解による切断パターンの変化は、本来切断されるべきGln221の付近の構造がG17が作用することで変化したためと考えられる。Gln221は立体構造上Gln226, Val229, Glu233近傍に位置しており(Fig. 13)、このこともGln226, Glu233付近がG17など差長の長い基質に対する立体構造の変化の可能性を強く示唆するもので

あるといえる。

以上の結果より、AMY-IIIの至適温度の低さは活性中心近傍の微細な立体構造によるものであり、またG17による阻害は一定の差長を認識する基質結合部位の存在によるものであると推察した。

要約

- 1) イネ培養細胞の生産する α -アミラーゼ-I、-III (AMY-I、AMY-III) のcDNAをクローニングし塩基配列を決定した。
- 2) AMY-I、AMY-IIIの大腸菌における大量発現系及び精製方法を確立した。
- 3) タンパク質工学的手法、及び分光学的手法を用いてAMY-IIIの酵素化学的に特異な性質に重要な部位を同定した。

原著論文

- 1) Rei Abe, Kensuke Yoshida, Masanobu Aoyagi, Shin Kasahara, Eiji Ichishima and Tasuku Nakajima
Construction of the chimeric enzymes between the two α -amylase isozymes obtained from suspension-cultured rice cells and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*.
submitted to *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- 2) Rei Abe, Eiji Ichishima and Tasuku Nakajima
Characterization of chimeric enzymes constructed between two distinct α -amylase cDNAs from cultured rice cells.
submitted to *Biosci. Biotechnol. Biochem.*.
- 3) Rei Abe, Eiji Ichishima and Tasuku Nakajima
Role of the α -helix-4 and α -helix-5, the regions critical for the unique characteristics of α -amylase-III (AMY-III) from suspension cultured rice cells.
to be submitted.
- 4) Rei Abe, Maki Kanesaka, Eiji Ichishima and Tasuku Nakajima
Mechanism of the inhibition by maltheptaose (Glc-17) on the activity of α -amylase-III (AMY-III) from suspension cultured rice cells.
to be submitted.

参考論文

- 1) Youhei Yamagata, Rei Abe, Yasunori Fujita and Eiji Ichishima
Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the 90K Serine Protease Gene, *hspK*, from *Bacillus subtilis* (*natto*) No. 16
Current Microbiology (1995) 31, 340-344
- 2) Tatsuyuki Midorikawa, Rei Abe, Youhei Yamagata, Tasuku Nakajima and Eiji Ichishima
Isolation and characterization of cDNA encoding chicken egg yolk aminopeptidase Ey
Comp. Biochem. Physiol. (1998) 119, 513-520

AMY-I	1:M-KNTSSLCLLLLWVLCSLTCNSGQAQVLFQGFNWESWRKQGGWYNMLKGQVDDIAKAGV	59
AMY-III	1:MGKHVTLCCVFAVLC-LASSLAQAQVLFQGFNWESWRKQGGWYNFLHEKVEETASTGA	59
AMY-I	60:THWMLPPPSHSAVPOGYMPGRLYDLDAASKYGTAAELKSLTAAPHKGVQCVAADVVINHC	119
AMY-III	60:THWMLPPPSHSAVPOGYMPGRLYDLDAASKYGTAAELKSLTAAPHKGVQCVAADVVINHC	119
AMY-I	120:AEKKDARGVYCVFEGGTPD-RLDWGPGMICSDDTQYSEGTGHRDTGEGFGAAPDIDHLNP	178
AMY-III	120:ADYKDSRGVYCVFEGGTPDGRLLDWGPGMICSDDTQYSEGTGHRDTGAGFGAAPDIDHLNP	179
AMY-I	179:RVQRELTDWLNWLKSDVGEDGWRLLDFAKGYSTDIARMYVESCKPGFVVAETWNLSYNGD	238
AMY-III	180:RVQRELTDWLNWLRTDLGEDGWRLLDFAKGYSAFLARTYVDNTNPTFVVGEIWSLSLYNGD	239
AMY-I	239:GKPAANQDQGRQELVNWNVAVGGPAMTFDFTTKGLLQAGVQGEIWLRLRDGNGKAPGMIGW	298
AMY-III	240:GKPSINQDADRQELVNWVEGVGKPATAFDFTTKGILQAAVQGEIWLRLHDGNGKAPGLMGW	299
AMY-I	299:LPEKAVTFVDNHLTGSTQKLWPFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHMFVNILKQETTA	358
AMY-III	300:MPDQAVTFVDNHLTGSTQSLWPFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHVFDVNLQHETAT	359
AMY-I	359:LAATIRNRNGINAGSKLRIVADADAYVAVVDEKVMVKIGTRYDVGNVPSDFHQTVHGKD	418
AMY-III	360:LAETRSRNGIHAESTLDILKAEGDIYVAMIDGKVITKLGPRVDAGGIIPSDFHVAHCND	419
AMY-I	419:YSWKEKGSRLVPAGR-HL	435
AMY-III	420:YCVWEKEGFRVPAGRKHY	437

Fig. 1. Deduced amino acid sequences of AMY-I and AMY-III from culutured rice cells. A, B, C and D were highly homologous regions in all α -amylases.

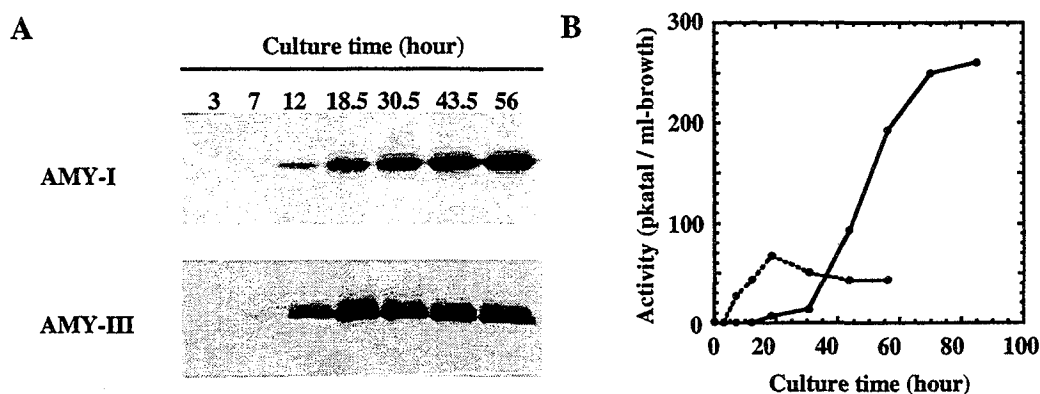


Fig. 2. Time course of AMY-I and AMY-III production in yeast cells. A; Western blot analysis of AMY-I and AMY-III. B; The activity of AMY-I and AMY-III in culture supernatant. Details were described in the text. AMY-I, (solid line); AMY-III, (dot line).

Table 1. Effects of corn starch and maltooligosaccharides on the activity of AMY-I and AMY-III expressed in yeast.

Effector	Remaining activity (%)	
	AMY-I	AMY-III
G7	98 (103)	93 (93)
G17	110 (92)	40 (13)
Corn starch	80 (100)	33 (20)

Parentheses indicate the effects of AMY-I and -III produced by suspension cultured rice cells.

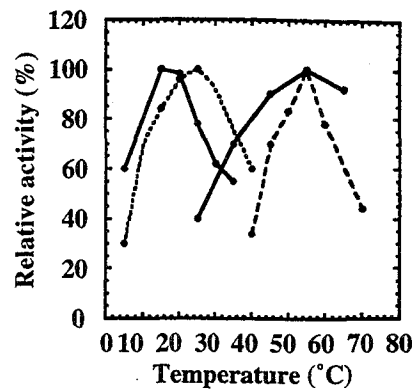


Fig. 3. The temperature dependence of the activity of AMY-I and AMY-III expressed in yeast. Details were described in the text. AMY-I; (full circle), AMY-III; (open circle), α -amylase from suspension cultured rice cell; (dot line), α -amylase expressed in yeast; (solid line).

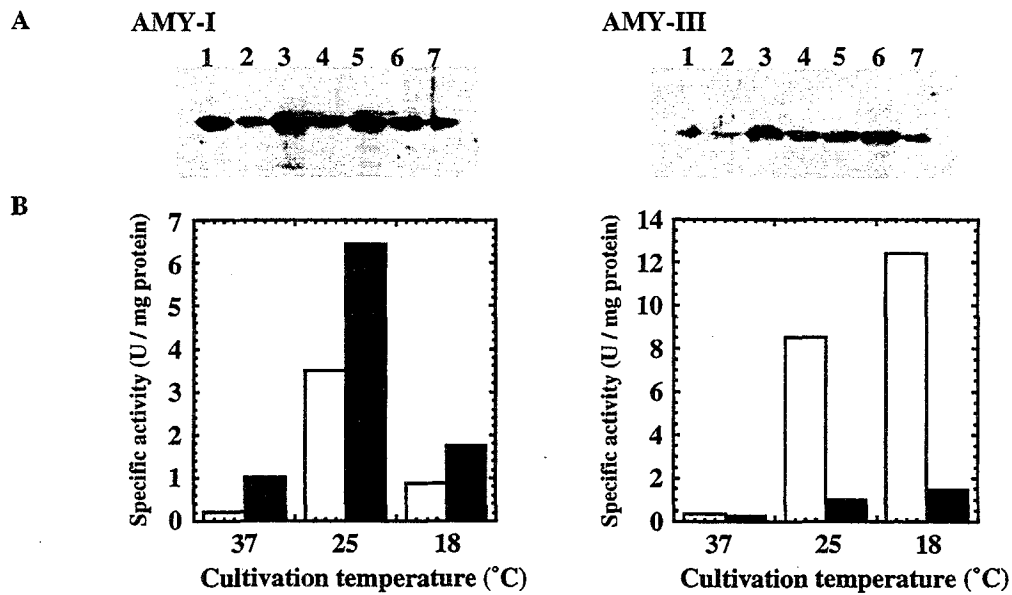


Fig. 4. Western blot analysis and the specific activity of AMY-I and AMY-III expressed under various cultivation temperature. A; Western blot analysis of α -amylases. Lane 1, purified enzyme from rice cells; 2-4, soluble fraction; 5-7, insoluble fraction; 2 and 5, cultivated at 37 °C; 3 and 6, at 25 °C; 4 and 7, at 18 °C. B; The specific activity of α -amylases. Specific activity indicated the α -amylases activity in 1 mg protein from the cell lysate. Details were described in the text. The activity measured at 50 °C, (full box); at 25 °C, (open box).

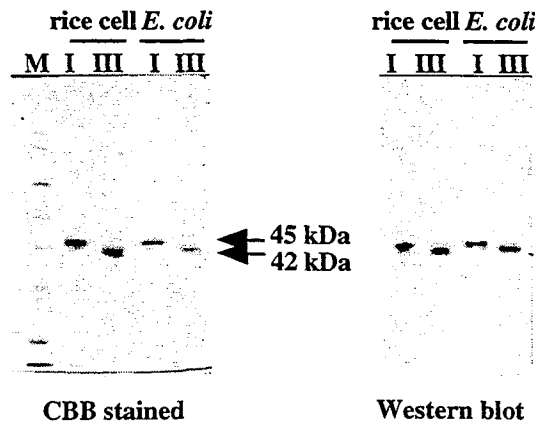


Fig. 5. SDS-PAGE and western blot analysis of purified AMY-I and AMY-III expressed in *E. coli*

Table 2. Effects of corn starch and maltooligosaccharides on the activity of AMY-I and AMY-III expressed in *E. coli*.

Effector	Remaining activity (%)	
	AMY-I	AMY-III
G7	97 (103)	110 (93)
G17	94 (92)	39 (13)
Corn starch	85 (100)	41 (20)

Parentheses indicate the effects of AMY-I and AMY-III produced by suspension cultured rice cells.

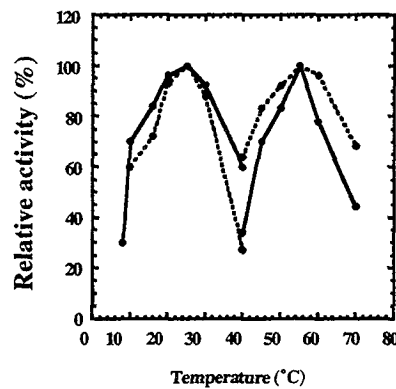


Fig. 6. The temperature dependence of the activity of AMY-I and AMY-III expressed in *E. coli*. Details were described in the text. AMY-I; (full circle), AMY-III; (open circle), α -amylase from suspension cultured rice cell, (dot line); α -amylase expressed in *E. coli*, (solid line)

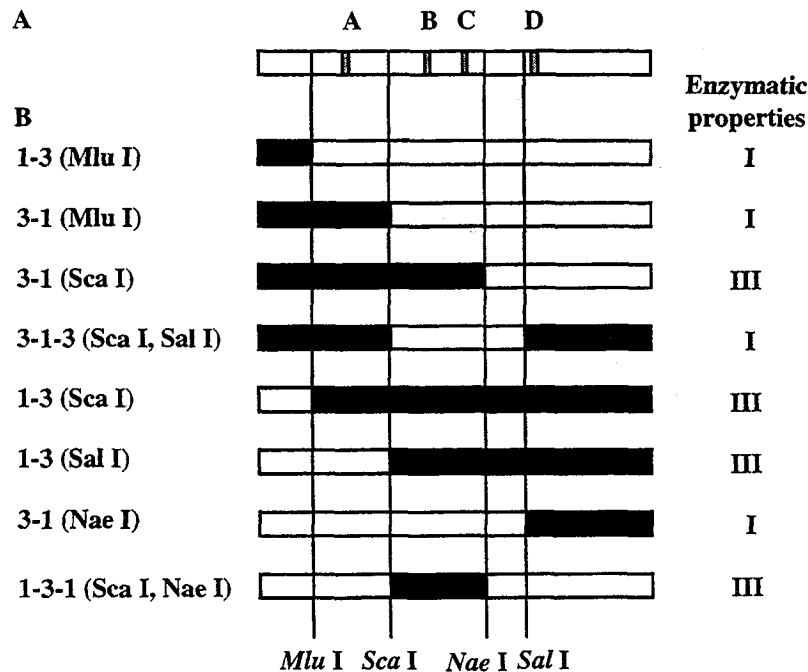


Fig. 7. Structure of chimeric genes and characteristics of chimeric α -amylases expressed in *E. coli*. A; Schematic structure of α -amylase. A, B, C and D were conserved regions in all α -amylases. B; Structure of chimeric genes. Details were described in the text. AMY-I; (open box), AMY-III; (full box).

Table 3. Effect of maltooligosaccharides and temperature dependence on the activity of chimeric α -amylase expressed in *E. coli*.

		Effector		Ratio of specific activity (50 °C / 25 °C)
		G7	G17	
AMY-I	rice cell	103	92	
	<i>E. coli</i>	98	110	1.3
AMY-III	rice cell	93	13	
	<i>E. coli</i>	93	40	0.3
1-3 (Mlu I)		89	13	0.3
3-1 (Mlu I)		127	84	1.7
3-1 (Sca I)		127	86	1.4
3-1-3 (Sca I, Sal I)		86	101	2.5
1-3 (Sca I)		22	10	0.6
1-3 (Sal I)		97	86	2.5
3-1 (Nae I)		69	11	0.4
1-3-1 (Sca I, Nae I)		30	23	0.2

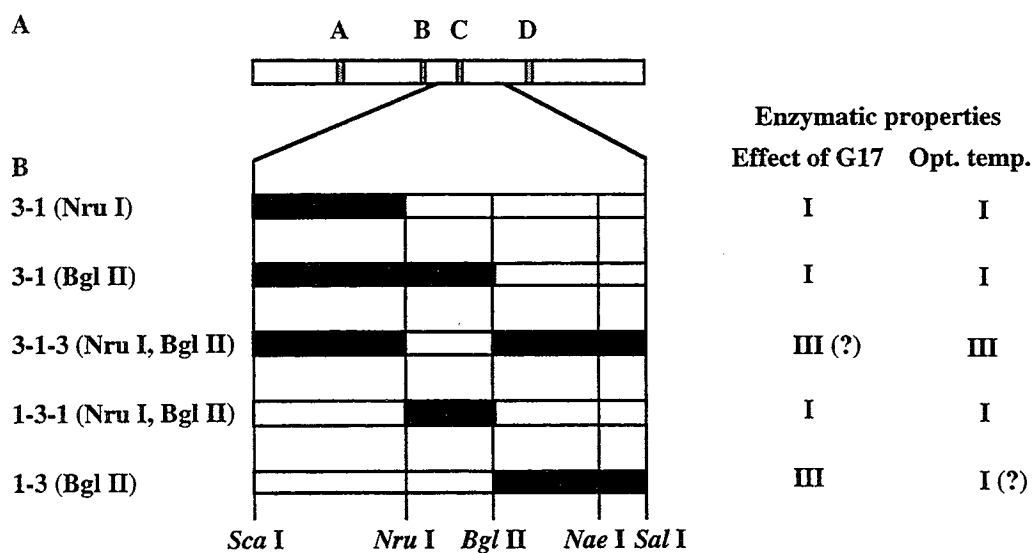


Fig. 8. Structure of chimeric genes and characteristics of chimeric α -amylases expressed in *E. coli*. A; Schematic structure of α -amylase. A, B, C and D were conserved regions in all α -amylases. B; Structure of chimeric genes. Details were described in the text. AMY-I; (open box), AMY-III; (full box).

Table 4. Effect of maltooligosaccharides and temperature dependence on the activity of chimeric α -amylase expressed in *E. coli*.

		Effector		Ratio of specific activity (50 °C / 25 °C)
		G7	G17	
AMY-I	rice cell	103	92	
	<i>E. coli</i>	98	110	1.3
AMY-III	rice cell	93	13	
	<i>E. coli</i>	93	40	0.3
3-1 (Nru I)		89	98	1.7
3-1 (Bgl II)		77	108	1.4
3-1-3 (Nru I, Bgl II)		100	51	0.2
1-3-1 (Nru I, Bgl II)		79	70	1.5
1-3 (Bgl II)		96	24	0.9

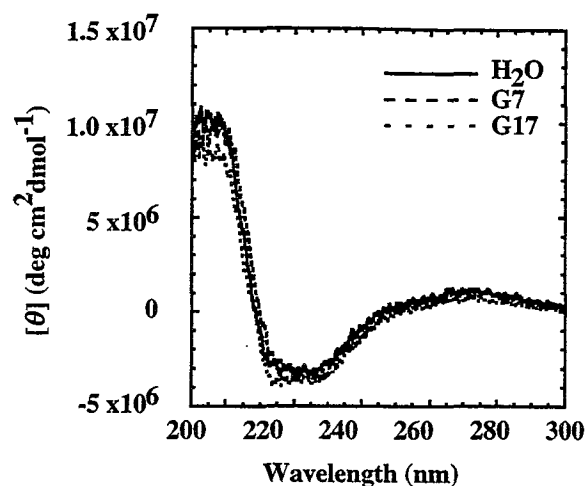


Fig. 10. Effect of maltooligosaccharides on circular dichroism (CD) spectra of AMY-III

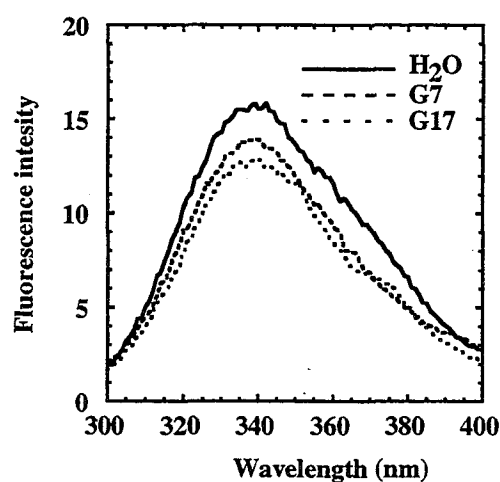


Fig. 11. Effect of maltooligosaccharides on fluorescence intensity of tryptophans in AMY-III

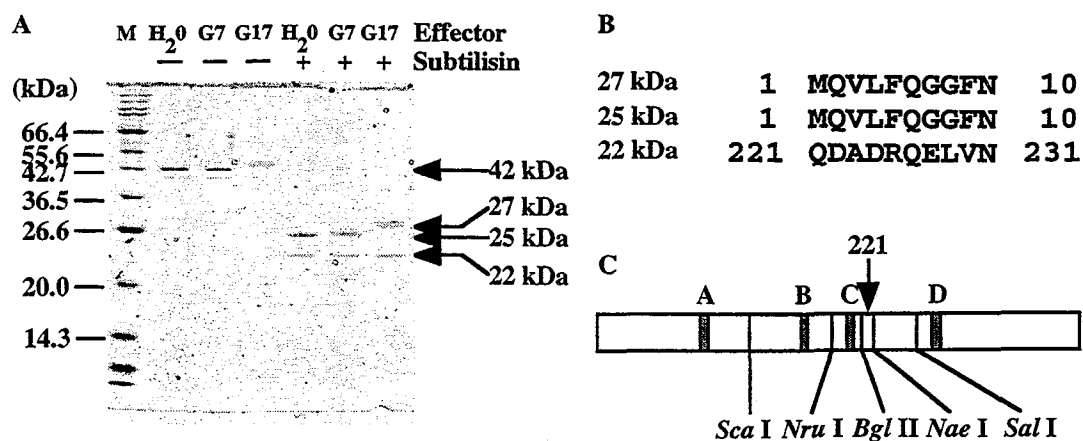


Fig. 12. Effect of maltooligosaccharides on the products from AMY-III digested with subtilisin. A; SDS-PAGE of AMY-III digested with subtilisin. B; N-terminal sequences of peptides from AMY-III digested with subtilisin. C; Schematic structure of AMY-III and the cleavage site with subtilisin.

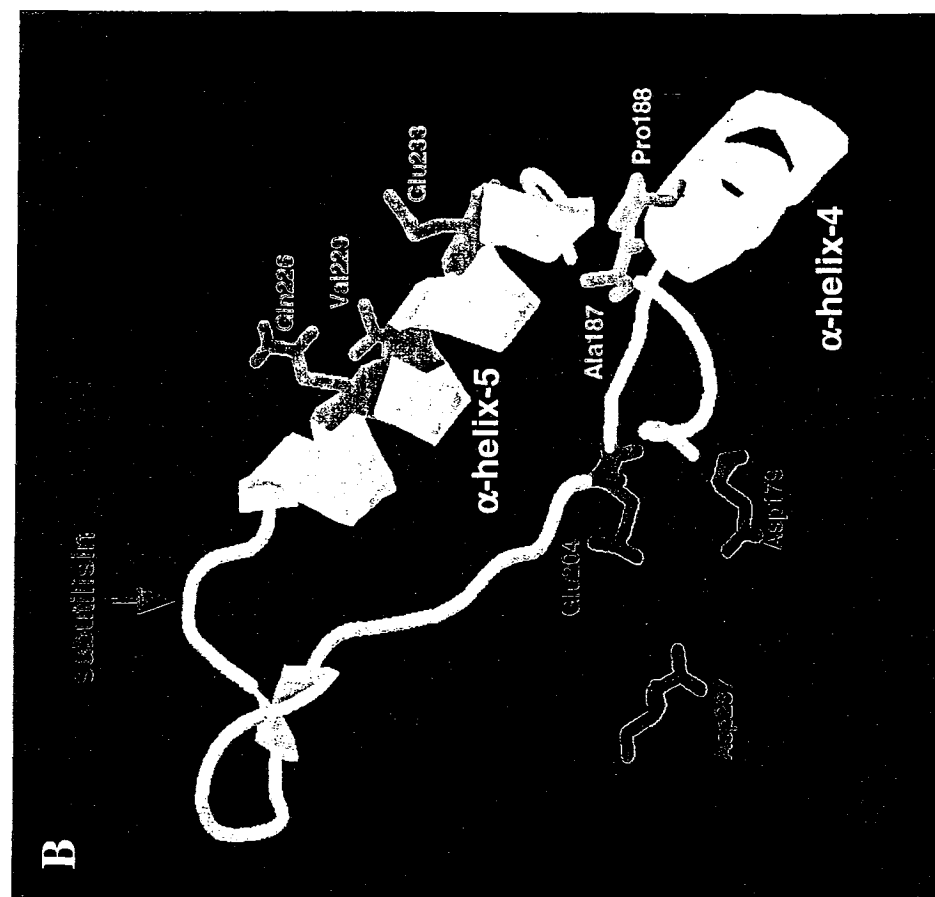


Fig. 13. Putative 3D structure of AMY-III. This model was based on barley α -amylase (file 1AMY in Brookhaven Protein Data Bank). A; Ribbon diagram of AMY-III. B; The active site and the partial structure from Ala181 to Ala239 of AMY-III.

論文審査結果要旨

イネ（ササニシキ）の培養細胞は三つのアイゾザイム（AMY-I, AMY-II, AMY-III）を産生する。そのうち AMY-III は植物体ではどの組織でも見出されておらず、唯一培養細胞につくられる特殊なアミラーゼと言える。

AMY-III は植物を含めて一般に知られている α -アミラーゼとは酵素化学的性質が著しく異なる。まずデンプン加水分解の至適温度が25℃と低く、重合度11以上のアミロデキストリンあるいは生デンプンにより活性が阻害される。このような至適温度の低さ、ある一定の鎖長を持つ基質が結合することで活性の制御が行なわれるという性質は、これまでの α -アミラーゼの研究では知られていない。

本研究では AMY-III の特異な酵素化学的性質が酵素タンパク分子の構造上のどのような変化に由来するものかを明らかにする目的で、タンパク質工学的手法を用い解析することにより α -アミラーゼの立体構造と触媒機能の相関について詳細に検討を加えた結果、以下のような新知見を得た。

候補者はイネ（ササニシキ）の培養細胞より、常温性の α -アミラーゼ（AMY-I）と低温性の α -アミラーゼ（AMY-III）の cDNA をクローニングし、両者の遺伝子をいろいろな箇所で組換えたキメラ遺伝子を作成した。

まず、制限酵素 *Mlu* I, *Sca* I, *Nae* I, *Sal* I の切断部位で組換えたキメラ遺伝子を作成し、新たに開発した大腸菌の発現系を用いキメラ酵素を取得し、それぞれの性質を検討した結果、*Sca* I, と *Nae* I の切断部には含まれた領域が酵素の性質を支配していることが明らかとなった。 α -アミラーゼは(α/β)₈ バレル構造をとっており、本研究で決定された領域は、 α -ヘリックス 4, β -シート 5, α -ヘリックス 5 が含まれている。さらに、この領域内の *Bgl* II の前後まで組換えたキメラ酵素を作成し、性質を検討した結果、 α -ヘリックス 5 が酵素の至適温度を決定するのに重要な領域であることが示された。

一方、アミロデキストリンによる活性の阻害は、部位突然変異を導入したキメラ酵素の性質を検討した結果、AMY-III の Ala 187, Pro188 が、ある一定の鎖長のアミロデキストリン（G-17）に親和性を示し特異的に結合することが明らかとなった。

以上、イネ培養細胞で得られた特異的な性質を持つ α -アミラーゼAMY-III の至適温度の低さは活性中心近傍の微細な立体構造のゆらぎによるものであり、また、アミロデキストリンによる活性阻害は、一定の鎖長を認識する基質結合部位の存在によるものであることが明確に示された。このような、イネアミラーゼの立体構造と活性の相関関係を詳細に研究した例はなく、審査員一同候補者は博士（農学）の学位を授与されるに充分の資格を有すると認定した。